

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003008

International filing date: 24 February 2005 (24.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US

Number: 60/547,075

Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 17 March 2005 (17.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

25.2.2005

PA 1278782

THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

February 01, 2005

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 60/547,075

FILING DATE: February 25, 2004

By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS



T. Lawrence

T. LAWRENCE
Certifying Officer

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

Express Mail Label No. _____

INVENTOR(S)		
Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Takahide	KOHRO	Tokyo, Japan
Additional inventors are being named on the <u>1</u> separately numbered sheets attached hereto		
TITLE OF THE INVENTION (500 characters max)		
PROMOTER OF Cdc42 PROTEIN TRANSFER INTO NUCLEOUS AND METHOD OF SCREENING THEREFOR		
Direct all correspondence to: CORRESPONDENCE ADDRESS		
<input checked="" type="checkbox"/> Customer Number:	38834	
OR		
<input type="checkbox"/> Firm or Individual Name	Westerman, Hattori, Daniels & Adrian, LLP	
Address	1250 Connecticut Avenue, N.W.	
Address	Suite 700	
City	Washington	State
Country	USA	Telephone
Zip	202-822-1100	Fax
20036		
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)		
<input checked="" type="checkbox"/> Specification Number of Pages <u>8</u>	<input type="checkbox"/>	CD(s), Number _____
<input checked="" type="checkbox"/> Drawing(s) Number of Sheets <u>1</u>	<input type="checkbox"/>	Other (specify) _____
<input type="checkbox"/> Application Date Sheet. See 37 CFR 1.76		
METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT		
<input type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27.	FILING FEE	
<input checked="" type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the filing fees.	Amount (\$)	
<input checked="" type="checkbox"/> The Director is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: <u>50-2866</u>	160.00	
<input type="checkbox"/> Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached.		
The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.		
<input checked="" type="checkbox"/> No.		
<input type="checkbox"/> Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____		

Respectfully submitted,

SIGNATURE 

TYPED or PRINTED NAME Sadao Kinashi

TELEPHONE 202-822-1100

[Page 1 of 2]

Date February 25, 2004

REGISTRATION NO. 48,075
(if appropriate)

Docket Number: 032217

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

This collection of information is required by 37 CFR 1.51. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 8 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Mail Stop Provisional Application, Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.

USPTO
601547075

022504

PROVISIONAL APPLICATION COVER SHEET
Additional Page

PTO/SB/16 (08-03)

Approved for use through 07/31/2006, OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

Docket Number 032217

INVENTOR(S)/APPLICANT(S)

Given Name (first and middle [if any])	Family or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)
Yoshikazu	SIBASAKI	Tokyo, Japan
Takao	HAMAKUBO	Tokyo, Japan
Tatsuhiro	KODAMA	Tokyo, Japan

[Page 2 of 2]

Number 1 of 1

WARNING: Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.

明細書

Cdc42タンパク質の核内移行促進剤及びそのスクリーニング方法

技術分野

本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤がCdc42タンパク質の核内への移行を促進する作用を有することを見出したものであり、即ち、本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤からなるCdc42タンパク質の核内移行促進剤、その使用、その方法に関する。また、本発明は、当該Cdc42タンパク質の核内移行促進剤を有効成分とする血管治療剤、及びCdc42タンパク質の核内移行能を測定することによる、血管治療剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

GTP結合タンパク質（Gタンパク質）は内在性のGTP加水分解活性をもつタンパク質で、mRNAの翻訳に関与するGタンパク質、7回膜貫通型レセプターに共役する三量体Gタンパク質及び低分子量Gタンパク質が知られている（実験医学 2003; 21: 137-145）。この内、低分子量Gタンパク質は分子量が2万～3万でサブユニット構造をもたないタンパク質で、これまで100種類以上報告されているが、Ras、Rho、Rab、Arf及びRanの五つのスーパーファミリーに分けられる（Physiol Rev 2001;81:153-208）。低分子Gタンパク質はイソプレニル化により細胞膜に移行し、GTP結合型（o n）／GDP結合型（o f f）として細胞内シグナル伝達に関与している。Rhoファミリーはアクチン細胞骨格の再編成を介して細胞機能を制御し、又、Rasファミリーと同様に遺伝子発現の調節に関与する。RhoファミリーはRho、Rac、Cdc42などのサブファミリーに分けられる。そして、Rhoはアクチントレスファイバーや接着斑の、Racはラメリポディアの、Cdc42は糸状突起（フィロポディア）の形成を誘導する一方、細胞接着により制御を受ける。

より詳細には、Cdc42は、分子量21kDaのタンパク質で、糸状突起（フィロポディア）の形成や細胞接着、細胞運動、細胞極性、遺伝子発現の制御などの種々の細胞活動に関与するタンパク質であることが知られている。Cdc42の活性型（GTP結合型）の標的タンパク質としては、PAK（p21-activated kinase）、MRCK（myotonic dystrophy kinase-related Cdc42 binding kinase）、WASP、及びIQGAP1などが知られている。Cdc42はPAKを活性化してMAPキナーゼカスケードを介して遺伝子の発現を制御し、WASPやMRCKと関連して接着斑（focal contact）及び糸状突起（フィロポディア）の形成に関与しており、またIQGAP1と関連して細胞間接着を制御している。

一方、HMG-C_oA（3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-C_oA）還元酵素阻害剤は、コレステロールの生合成における早期律速段階、すなわちHMG-C_oAのメバロン酸への転換を触媒する酵素の阻害剤であり、高コレステロール血症治療剤として知られている。HMG-C_oA還元酵素阻害剤は、大規模試験において動脈硬化疾患の発症を低下させることが検証されているが、オーバーラップ解析などからこれにはコレステロール低下と共にコレステロール低下以外の血管壁直接作用が関与していることが示されてきている。HMG-C_oA還元酵素阻害剤はコレステロール合成の中間体であるイソプレノイドの低下を介して低分子Gタンパク質の活性を低下させ、細胞機能に様々な影響を及ぼすと考えられる。HMG-C_oA還元酵素阻害剤は血管壁で抗炎症反応を示し動脈硬化を抑制すると考えられている。即ち、内皮細胞活性化を抑制、内皮機能を改善、単球／マクロファージの接着、泡沫化を抑制改善し、平滑筋の遊走・増殖を抑制し、plaquesを安定化するが、これらの作用にはRhoサブファミリーの低分子Gタンパク質、Rho、Rac、Cdc42の関与が報

告されている。特にHMG-C_oA還元酵素阻害薬の内皮機能改善効果は服用開始後短期間で著明に発現し、諸作用の中で重要と考えられる。Racについては、最近、血管壁におけるアンジオテンシンII、PDGF、トロンビン、エンドセリン、ロイコトリエンB₄などのシグナル伝達に関与し、NADPHの活性を亢進して血管病の進展に重要な役割を果たすことが明らかにされた (Am J Physiol Cell Physiol 2003;285:C723-734)。また、Cdc42についても、血管内皮細胞の増殖及びバリアー機能の回復 (J Biol Chem. 2002;277:4003-9、Circ Res 2004;94:159-166)、又エンドセリンのシグナル伝達 (J Biol Chem. 2003;278:29890-900) に関与していることが知られている。

発明の開示

本発明者らは、新規HMG-C_oA還元酵素阻害薬、ピタバスタチンの内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を検討し、ピタバスタチンが炎症性サイトカインIL-1、MCP-1の発現を抑制、血管拡張・収縮に関するNOシンターゼ・エンドセリンの発現を促進・抑制、凝固線溶系のトロンボモジュリンの発現を促進、PAI-1の発現を抑制することを見出してきた (J Atheroscler Thromb, 2002;9:178-183)。更に発明者らは鋭意研究の結果、驚くべきことにRacとCdc42が、Rhôと異なりHMG-C_oA還元酵素阻害剤等のイソプレノイド合成阻害剤又はゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤処理により核内に移行することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤のCdc42タンパク質の核内移行促進剤としての新たな用途を提供するものであり、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤を含有してなるCdc42タンパク質の核内移行促進剤、並びにイソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤のCdc42タンパク質の核内への移行促進剤としての使用、及びイソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤を細胞に投与することからなるCdc42タンパク質の核内への移行を促進させる方法を提供する。

また、本発明は、Cdc42タンパク質の核内への移行促進剤を有効成分とする血管治療剤、Cdc42タンパク質の核内への移行促進剤及び製薬上許容される担体を含有してなる血管治療用の医薬組成物を提供する。即ち、本発明は、Cdc42タンパク質の核内への移行促進剤の血管治療剤の製造のための使用、及び治療・予防に必要な有効量のCdc42タンパク質の核内への移行促進剤を血管障害の予防・治療を必要とする患者に投与することからなる血管障害の治療・予防方法を提供する。本発明のCdc42タンパク質の核内への移行促進剤としては、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤が挙げられることから、本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤を含有してなるCdc42タンパク質の核内への移行促進剤を有効成分とする血管治療剤を提供する。即ち、本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤を含有してなるCdc42タンパク質の核内への移行促進剤の血管治療剤の製造のための使用、及び治療・予防に必要な有効量のイソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはイソプレノイド合成阻害剤、より好ましくはイソプレノイド合成阻害剤の1種であるHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤を含有してなるCdc42タンパク質の核内への移行促進剤を血管障害の予防・治療を必要とする患者に投与することからなる血管障害の治療・予

防方法を提供する。

さらに、本発明は、C d c 4 2 タンパク質の核内への移行を測定することを特徴とする血管治療剤のスクリーニング方法を提供する。より詳細には、C d c 4 2 タンパク質を発現している細胞に被検物質を添加し、C d c 4 2 タンパク質の核内への移行を測定することからなる血管治療剤のスクリーニング方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、G F PとC d c 4 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子を導入した細胞を蛍光顕微鏡で観察したときの写真である。

図2は、G F PとC d c 4 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子を導入した細胞にピタバスタチンを添加し蛍光顕微鏡で観察したときの写真である。

図3は、G F PとC d c 4 2 の融合タンパク質をコードする遺伝子を導入した細胞にピタバスタチンを添加し、さらに核染色色素ヘキスト (Hoechst) で核を染色（赤色）して蛍光顕微鏡で観察したときの写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、HMG-C o A還元酵素阻害剤としてピタバスタチンを用いて、ヒト血管内皮細胞 H U V E C におけるC d c 4 2 タンパク質の挙動を測定した。そのために、C d c 4 2 と蛍光タンパク質であるG F Pとの融合タンパク質をコードする遺伝子をH U V E C細胞に導入し、G F P-C d c 4 2 融合タンパク質が発現する細胞を調製した。

この細胞を培養し、ピタバスタチンを添加した後のC d c 4 2 の分布状態をG F Pによる蛍光として観察した。これらの結果を図1～図3に示す。

図1はピタバスタチンを添加していない状態における形質転換細胞の状態を蛍光顕微鏡で観察した結果を示す図面に代わる写真である。G F Pによる蛍光が細胞のほぼ全域にわたって観察できる。このことは、C d c 4 2 タンパク質が細胞全域に分布していることを示している。次に、この細胞にピタバスタチンを添加した後の蛍光を観察した結果を図2として図面に代わる写真で示す。G F Pによる蛍光が細胞の一箇所に局在していることがわかる。局在位置をさらに確認するために、同じ状態でヘキスト (Hoechst) (Lydon M., et al., J. Cell Physiol., 102, 175-181 (1980); Sriram M., et al., Biochemistry, 31, 11823-11834 (1992)) で染色した結果を図3として図面に代わる写真で示す。図3では、ヘキストで染色された核が赤く観察されている。ヘキストで赤色に染色された部分にG F Pによる蛍光が局在化していることがわかる。ここで使用したヘキストは、細胞膜透過性を有するD N A に結合する蛍光色素であり、D N A の副溝のA T配列に特異的に結合するものである。

この結果、血管内皮細胞をピタバスタチンで処理すると、G F P-C d c 4 2 が核染色色素ヘキストによる染色部位と同位置に集積し、C d c 4 2 タンパク質が核に移行したことが示された。即ち、HMG-C o A還元酵素阻害剤には、細胞内のC d c 4 2 タンパク質を核に移行する作用を有していることが判明した。ピタバスタチンのこのような作用は、コレステロール合成中間体のイソプレノイド（特にゲラニルゲラニルピロリン酸）の低下に起因するC d c - 4 2 タンパク質のゲラニルゲラニル化抑制によるものと考えられる。

したがって、本発明は、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤のC d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤としての新規な用途を提供するものである。

本発明のC d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤は、C d c 4 2 タンパク質の糸状突起（フィロポディア）の形成や細胞接着、細胞運動、細胞極性、遺伝子発現の制御などの作用や血管内皮細胞の透過性及び増殖作用からして、血管治療剤、特に内皮細胞機能改善剤、細胞接着阻害剤として有用であると考えられる。

このような本発明のC d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤としては、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤からなる群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤が挙げ

られる。

本発明のイソプレノイド合成阻害剤としては、HMG-C_oA合成酵素阻害剤(Proc Natl Acad Sci USA.1987;84:7488-92)、HMG-C_oA還元酵素阻害剤、フィブラーート等のAMPK活性化剤(Biochem Soc Trans.1997;25:S676)、N含有ビスホスホネート等のファルネシルピロリン酸合成酵素阻害剤(Biochem Biophys Res Commun 1999;264:108-111)などが挙げられる。また、本発明のグラニルグラニル転移酵素阻害剤としては、公知の文献(例えば、Biochemical Pharmacology 2000;60:1061-1068)等に記載されたものなどが挙げられる。これらの酵素阻害剤は、これらの酵素の活性を完全に又は部分的に阻害することができる活性を有するものであればよい。本発明のCdc42タンパク質の核内への移行促進剤としては、イソプレノイド合成阻害剤、特にHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤が好ましい。これらの薬剤は、製剤学的に必要であれば、塩や溶媒和物として使用することもできる。より具体的には、例えば、

ロバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロー-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロー-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル(S)-2-メチルブチレート(米国特許第4, 231, 938号参照))；

シンバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロー-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロー-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル2, 2-ジメチルブタノエート(米国特許第4, 444, 784号参照))；

プラバスタチン(化学名:(+)-(3R, 5R)-3, 5-ジヒドロキシ-7-[(1S, 2S, 6S, 8S, 8aR)-6-ヒドロキシ-2-メチル-8-[(S)-2-メチルブチリルオキシ]-1, 2, 6, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロー-1-ナフチル]ヘプタン酸(米国特許第4, 346, 227号参照))；

フルバスタチン(化学名:(3RS, 5SR, 6E)-7-[3-(4-フルオロフェニル)-1-(1-メチルエチル)-1H-インドール-2-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 354, 772号参照))；

アトルバスタチン(化学名:(3R, 5R)-7-[2-(4-フルオロフェニル)-5-イソプロピル-3-フェニル-4-フェニルカルバモイル-1H-ピロル-1-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプタン酸(米国特許第5, 273, 995号参照))；

セリバスタチン(化学名:(3R, 5S)-エリスロー(E)-7-[4-(4-フルオロフェニル)-2, 6-ジイソプロピル-5-メトキシメチル-ビリジン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 177, 080号参照))；

メバスタチン(化学名:(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロー-7-メチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロー-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル(S)-2-メチルブチレート(米国特許第3, 983, 140号参照))；

ロスバスタチン(化学名:7-[4-(4-フルオロフェニル)-6-イソプロピル-2-(N-メチル-N-メタンスルホニルアミノピリミジン)-5-イル]-3(R, 5S)-ジヒドロキシ(E)-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 260, 440号、日本国特許第2, 648, 897号参照))；

ピタバスタチン((3R, 5S, 6E)-7-[2-シクロプロピル-4-(4-フルオロフェニル)-3-キノリル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸(米国特許第5, 856, 336号、日本国特許第2, 569, 746号参照))；

又はそれらの塩などが挙げられる。

本発明における好ましいHMG-C_oA還元酵素阻害剤としては、ロバスタチン、プラバスタチン、シンバスタチン、フルバスタチン、セリバスタチン、アトルバスタチン、ピタバスタチン又はロスバスタチン、及びそれぞれの場合においてその薬学的に許容される塩からなる群から選ばれる化合物が

挙げられる。さらに好ましいHMG-C_oA還元酵素阻害剤としては、ピタバスタチンが挙げられる。

本発明のC_dc₄2タンパク質の核内への移行を測定することを特徴とする血管治療剤のスクリーニング方法としては、C_dc₄2タンパク質を標識又は染色し、その核内移動を同定する方法などが挙げられる。C_dc₄2タンパク質を標識する方法としては分子遺伝学的手法が挙げられ、染色する方法としては免疫学的手法などが挙げられる。C_dc₄2タンパク質を標識する方法として、具体的には緑色蛍光蛋白質（GFP）（宮脇敦史：蛍光バイオイメージングで細胞内現象を可視化する。理研ニュース255：2002年9月）をはじめとする蛍光タンパク質BFP、CFP及びYFPなどの利用が挙げられる。染色する方法として具体的には蛍光抗体又は酵素抗体の利用が挙げられる。特にGFPを分子遺伝学的にC_dc₄2タンパク質に組み込み、その組換タンパク質の核内移行を視覚的に同定する方法が好ましい。

本発明のC_dc₄2タンパク質の核内への移行促進剤は、医薬組成物として血管障害の治療・予防に使用されるだけでなく、各種の細胞を用いた試験においてC_dc₄2タンパク質を細胞の核内に局在させておきたいときの試薬として使用することもできる。即ち、医薬組成物における有効成分として使用されるだけでなく、実験用の試薬や診断薬における試薬などとして使用することもできる。

本発明の血管治療剤としては、前記した本発明のC_dc₄2タンパク質の核内への移行促進剤、及び製薬学的に許容される担体とからなる血管治療用の医薬組成物が挙げられる。

本発明の血管治療剤の投与経路としては、例えは錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与又は静脈内注射剤、筋肉内注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、点鼻剤等による非経口投与が挙げられる。

また、このような種々の剤型の医薬製剤を調製するには、この有効成分を単独で、又は他の薬学的に許容される賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嗜味剤、香料、被膜剤、担体、希釈剤等を1種又はそれ以上と適宜組み合わせて用いることができる。

特に、HMG-C_oA還元酵素阻害剤は、これらの投与経路のうち、経口投与が好ましい。経口投与用製剤の調製にあたっては、有効成分の安定性を考慮してpHを調整（特開平2-6406号、日本国特許第2,774,037号、WO97/23200号等。これらの文献を参照して本明細書に取り込む。）するのが好ましい。

これらの医薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、有効成分をイソプレノイド合成阻害剤及びグラニルグラニル転移酵素阻害剤として、一日0.01～1000mg、特に0.1～100mgを、1回又は数回に分けて経口投与又は非経口投与するのが好ましい。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

実施例1

GFP遺伝子を含有しているプラスミドpEGFP-C1にC_dc₄2の翻訳領域の全領域をコードする遺伝子を導入してGFP-C_dc₄2遺伝子を含有するプラスミドを構築した。

HUVEC細胞を6ウェルのプレートに播種した後、1夜EGM-2培地で培養した。この細胞に、フジネ6（Fugene6）を用いて1ウェル当たり0.8μgの前記で調製したプラスミド構築物DNAを添加した。21時間EGM-2培地で培養した後、GFPによる蛍光を蛍光顕微鏡で観察した結果を図1に示す。

一方、プラスミド構築物DNAを添加して、同様に培養し、6時間後にピタバスタチンを最終濃度が1μMとなるように添加し、静置して15時間培養した。その後、プレパラート上に固定し、蛍光顕微鏡で観察した結果を図2に示す。同時に核染色色素ヘキストで染色した結果を図3に示す。

請求の範囲

1. イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤を含有してなる C d c 4 2 タンパク質の核内移行促進剤。
2. イソプレノイド合成阻害剤が、HMG-C o A 合成酵素阻害剤、HMG-C o A 還元酵素阻害剤、AMPK 活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤である請求の範囲第 1 項に記載の C d c 4 2 タンパク質の核内移行促進剤。
3. HMG-C o A 還元酵素阻害剤が、ピタバスタチンである請求の範囲第 2 項に記載の C d c 4 2 タンパク質の核内移行促進剤。
4. イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤の C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤としての使用。
5. イソプレノイド合成阻害剤が、HMG-C o A 合成酵素阻害剤、HMG-C o A 還元酵素阻害剤、AMPK 活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤である請求の範囲第 4 項に記載の C d c 4 2 タンパク質の核内移行促進剤としての使用。
6. HMG-C o A 還元酵素阻害剤が、ピタバスタチンである請求の範囲第 5 項に記載の C d c 4 2 タンパク質の核内移行促進剤としての使用。
7. イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤を細胞に投与することからなる C d c 4 2 タンパク質の核内への移行を促進させる方法。
8. イソプレノイド合成阻害剤が、HMG-C o A 合成酵素阻害剤、HMG-C o A 還元酵素阻害剤、AMPK 活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤である請求の範囲第 7 項に記載の方法。
9. HMG-C o A 還元酵素阻害剤が、ピタバスタチンである請求の範囲第 8 項に記載の方法。
10. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤及び製薬上許容される担体を含有してなる血管治療用の医薬組成物。
11. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤である請求の範囲第 10 項に記載の医薬組成物。
12. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、HMG-C o A 合成酵素阻害剤、HMG-C o A 還元酵素阻害剤、AMPK 活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤である請求の範囲第 10 項に記載の医薬組成物。
13. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、HMG-C o A 還元酵素阻害剤から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤である請求の範囲第 10 項に記載の医薬組成物。
14. HMG-C o A 還元酵素阻害剤が、ピタバスタチンである請求の範囲第 13 項に記載の医薬組成物。
15. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤の血管治療剤の製造のための使用。
16. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤である請求の範囲第 15 項に記載の使用。
17. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、HMG-C o A 合成酵素阻害剤、HMG-C o A 還元酵素阻害剤、AMPK 活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤である請求の範囲第 15 項に記載の使用。
18. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、HMG-C o A 還元酵素阻害剤から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤である請求の範囲第 15 項に記載の使用。
19. HMG-C o A 還元酵素阻害剤が、ピタバスタチンである請求の範囲第 18 項に記載の使用。
20. 治療・予防に有効量の C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤を血管障害の予防・治療を必要とする患者に投与することからなる血管障害の治療・予防方法。
21. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、イソプレノイド合成阻害剤及びゲラニルゲラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる 1 種又は 2 種以上の薬剤である請求の範囲第 20 項に記載の

方法。

22. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、HMG-C o A合成酵素阻害剤、HMG-C o A還元酵素阻害剤、AMPK活性化剤又はファルネシルピロリン酸合成酵素剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤である請求の範囲第20項に記載の方法。

23. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行促進剤が、HMG-C o A還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤である請求の範囲第20項に記載の方法。

24. HMG-C o A還元酵素阻害剤が、ピタバスタチンである請求の範囲第23項に記載の方法。

25. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行を測定することを特徴とする血管治療剤のスクリーニング方法。

26. C d c 4 2 タンパク質を発現している細胞に被検物質を添加し、C d c 4 2 タンパク質の核内への移行を測定することからなる血管治療剤のスクリーニング方法

27. C d c 4 2 タンパク質の核内への移行の測定が蛍光の発酵によるものである請求の範囲第25又は26項に記載のスクリーニング方法。

28. C d c 4 2 タンパク質を緑色蛍光蛋白(GFP)又はその類縁蛋白により標識することを特徴とする請求の範囲第27項に記載のスクリーニング方法。

要約書

本発明は、HMG-C_oA合成酵素阻害剤、HMG-C_oA還元酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素剤等のイソプレノイド合成阻害剤及びグラニルグラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤、好ましくはHMG-C_oA還元酵素阻害剤から選ばれる1種又は2種以上の薬剤がCdc42タンパク質の核内への移行を促進する作用を有することを見出したものであり、即ち、本発明は、HMG-C_oA合成酵素阻害剤、HMG-C_oA還元酵素阻害剤、AMPK活性化剤、ファルネシルピロリン酸合成酵素剤等のイソプレノイド合成阻害剤及びグラニルグラニル転移酵素阻害剤の群から選ばれる1種又は2種以上の薬剤からなるCdc42タンパク質の核内移行促進剤、その使用、その方法に関する。また、本発明は、Cdc42タンパク質の核内移行促進剤を有効成分とする血管治療剤及びCdc42タンパク質の核内移行能を測定することによる、血管治療剤のスクリーニング方法に関する。

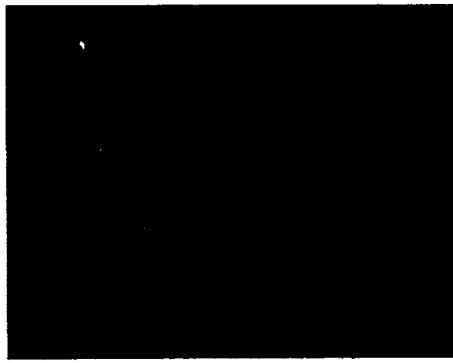
【図1】



【図2】



【図3】



BEST AVAILABLE COPY